

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶: A61L 2/18, A61K 35/16	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/09657 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 13. April 1995 (13.04.95)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP94/03298 (22) Internationales Anmeldedatum: 6. Oktober 1994 (06.10.94) (30) Prioritätsdaten: P 43 34 087.3 6. Oktober 1993 (06.10.93) DE P 44 34 538.0 27. September 1994 (27.09.94) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT [AT/AT]; Industriestrasse 67, A-1221 Wien (AT). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EIBL, Johann [AT/AT]; Gustav Tschermak-G. 2, A-1180 Wien (AT). DORNER, Friedrich [AT/AT]; Peterlinigasse 17, A-1230 Wien (AT). BARRETT, Noel [IE/AT]; Steinwandgasse 6A, A-3400 Klostemeuburg/Weidling (AT). (74) Anwälte: KOLB, Helga usw.; Arabellastrasse 4, D-81925 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: CA, CZ, FI, HU, JP, KR, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: PROCESS FOR VIRUS DEACTIVATION IN THE PRESENCE OF POLYALKYLENE GLYCOL AND THE PHARMA- CEUTICAL PREPARATION THUS OBTAINED (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR VIRUSINAKTIVIERUNG IN GEGENWART VON POLYALKYLENGLYKOL SOWIE DIE DABEI ERHALTENE PHARMAZEUTISCHE PRÄPARATION (57) Abstract The invention relates to a pharmaceutical preparation containing a plasma protein, said preparation's being free from infectious agents and largely free from denaturing products and obtainable by a process comprising the following steps: a) addition of a polyether to a solution containing the plasma protein, with possible lyophilisation of the solution; b) deactivation of infectious agents in the present of the polyether by a physical-chemical or chemical treatment; and c) removal of the polyether. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft eine pharmazeutische Präparation, enthaltend ein Plasmaprotein, welche Präparation frei von infektiösen Agenzien sowie weitgehend frei von Denaturierungsprodukten ist und erhältlich ist durch ein Verfahren, das die folgenden Schritte umfaßt: a) Zugabe eines Polyethers zu einer das Plasmaprotein enthaltenden Lösung, gegebenenfalls Lyophilisierung der Lösung, b) Inaktivierung von infektiösen Agenzien in Gegenwart des Polyethers durch eine physikalisch-chemische oder chemische Behandlung, und c) Entfernung des Polyethers.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

**Verfahren zur Virusinaktivierung
in Gegenwart von Polyalkylenglykol
sowie die dabei erhaltene pharmazeutische Präparation**

B E S C H R E I B U N G

Die Erfindung betrifft eine pharmazeutische Präparation, enthaltend ein Plasmaprotein, welche durch ein hoch wirksames Verfahren zur Inaktivierung von infektiösen Agenzien unter Erhaltung der biologischen Aktivität erhältlich ist.

Die Erfindung umfaßt auch ein Verfahren zur Herstellung der genannten pharmazeutischen Präparation, welches nachweislich potentiell vorhandene Viren inaktiviert.

Plasmaproteine sind Proteine, die aus menschlichem oder tierischem Blut bzw. Plasma gewonnen werden können. Die Plasmaproteine sind als pharmazeutische Präparation zur therapeutischen, prophylaktischen oder diagnostischen Anwendung bestimmt. Solche Präparationen können Enzyme, Proenzyme einschließlich Gerinnungsfaktoren, Enzymcofaktoren, Enzyminhibitoren, Immunglobuline, Albumin, Plasminogen, Fibrinogen, Fibronectin, t-PA, Urokinase, Prourokinase oder Plasma enthalten. Als Plasmaproteine werden ebenso rekombinante Polypeptide verstanden, die aufgrund ihrer Eigenschaften den genannten Plasmaproteinen äquivalent sind.

Unter biologischen Präparaten werden pharmazeutisch anwendbare Präparate verstanden, die biologischen Ursprungs sind, d.h. aus natürlichen Quellen isoliert oder aus

Zellkulturen gewonnen bzw. rekombinant hergestellt sind. Ein biologisches Präparat enthält beispielsweise ein Plasmaprotein oder eine Vaccine, insbesondere ein virales Antigen.

Zu den biologischen Präparaten zählen aber auch Immunglobulinpräparate, monoklonale Antikörper oder deren Fragmente, Überstände von Zellkulturen oder Ascitesflüssigkeit von Mäusen.

Bei der Verabreichung eines biologischen Präparates, insbesondere eines Plasmaprotein-haltigen Präparates besteht ein Infektionsrisiko durch potentiell vorhandene infektiöse Agenzien, wie Hepatitis- oder AIDS-Viren. Das Herstellungsverfahren dieser Präparate muß daher geeignete Inaktivierungsmaßnahmen umfassen.

Unter infektiösen Agenzien werden Krankheitserreger verstanden, die von einem Organismus auf einen anderen Organismus übertragen werden können, beispielsweise Viren oder Prionen.

Es liegt eine umfangreiche Literatur vor, die sich mit der Inaktivierung von infektiösen Agenzien in pharmazeutischen Präparationen befaßt.

Als eine der wirksamsten Methoden zur Inaktivierung von Viren gilt das Erhitzen von Plasmaproteinen in Lösung. Es ist bekannt, daß eine virussichere albuminhaltige Präparation durch Erhitzen einer wäßrigen Albuminlösung bei einer Temperatur von 60°C während 10 h hergestellt werden kann. Die biologische Aktivität des Albumins ist dabei nicht beeinträchtigt, da Albumin ein relativ stabiles Plasmaprotein ist.

Durch den Zusatz von Ammoniumsulfat ist im Stand der Technik eine Erhöhung der Virusinaktivierungskapazität einer Wärmebehandlung von Blutprodukten in Lösung beschrieben (EP-124 506). Dabei ist das Problem der gleichzeitigen Inaktivierung von Plasmaproteinen bekannt, weshalb vorgeschlagen wird, Protein-stabilisierende Substanzen, wie Glycin, zuzusetzen. Eine erwünschte Stabilisierung der Plasmaproteine bedeutet aber gleichzeitig eine unerwünschte Stabilisierung der infektiösen Agenzien. Das Bestreben geht also dahin, eine Infektivität der Präparation auszuschließen und gleichzeitig ihre biologische Aktivität weitgehend zu erhalten.

Ein Zusatz von Stabilisatoren zu Plasmaprotein-haltigen Lösungen ist beispielsweise aus EP-292 003 bekannt. Als Stabilisatoren werden Saccharide oder Zuckeralkohole und neutrale Salze, wie Acetate, Phosphate und Sulfate zugesetzt. Salze haben hier eine stabilisierende Wirkung.

Eine virusinaktivierende Wirkung von Salzen ist hingegen in WO-90/07524 beschrieben. Antikörper gegen Protein C sind bei 22°C mindestens 2 h in Gegenwart von mindestens 2,6 M Guanidin oder 2 M Kaliumthiocyanat stabil. Eine solche Behandlung wird auch vorgeschlagen, um potentiell vorhandene Viren zu inaktivieren. Die genannten Verbindungen haben aufgrund ihres chaotropen Verhaltens nicht nur inaktivierende Wirkung gegenüber Viren, sondern auch gegenüber Proteinen. Deshalb ist es beachtlich, daß die Antikörper bei Raumtemperatur eine gewisse Zeit mit diesen Verbindungen inkubiert werden können, ohne ihre Affinität zu Protein C zu verlieren.

Aus WO-90/15613 ist ein Verfahren zur Inaktivierung von Viren durch Zusatz von Natriumthiocyanat zu Plasmaprotein-haltigen Lösungen bekannt. Um das Plasmaprotein nicht zu denaturieren

wird darauf geachtet, daß die Behandlung möglichst bei 4°C und während einer kurzen Behandlungsdauer erfolgt.

Thiocyanate werden darüber hinaus als Elutionsmittel im Rahmen einer Immunaффinitätschromatographie eingesetzt. Im Anschluß an die Elution erfolgt unmittelbar die Entfernung des Thiocyanates, um eine Schädigung des gereinigten Proteins zu verhindern (vgl. US-5 055 557).

Die Erfindung stellt sich die Aufgabe, eine pharmazeutische Präparation, enthaltend ein Plasmaprotein, zur Verfügung zu stellen, die aufgrund ihres Herstellungsverfahrens frei von infektiösen Agenzien sowie weitgehend frei von Denaturierungsprodukten ist.

Die vorstehende Aufgabe wird gemäß der Erfindung durch eine pharmazeutische Präparation, enthaltend ein Plasmaprotein, gelöst, welche erhältlich ist durch ein Verfahren, das die folgenden Schritte umfaßt:

- a) Zugabe eines Polyethers zu einer das Plasmaprotein enthaltenden Lösung, gegebenenfalls Lyophilisieren der Lösung,
- b) Inaktivierung von infektiösen Agenzien in Gegenwart des Polyethers durch eine physikalisch-chemische oder eine chemische Behandlung, und
- c) Entfernung des Polyethers.

Polyether umfassen gemäß der Erfindung auch Polyhydroxyether, wie Polyalkylenglykol, und insbesondere Polyethylenglykol und Polypropylenglykol.

Eine bevorzugte Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, daß man in Stufe (b) die Inaktivierung von infektiösen Agenzien in Gegenwart des Polyethers und eines chaotropen Agens durchführt und in Stufe (c) den Polyether und das chaotrope Agens entfernt. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, daß man in Stufe (a) als Polyether ein niedermolekulares Polyethylenglykol ausgewählt aus der Gruppe PEG 200, PEG 300, PEG 400, PEG 600, PEG 900 und PEG 1000 zugibt, (b) die Inaktivierung von infektiösen Agenzien in Gegenwart des Polyethylenglykols durchführt, und (c) das Polyethylenglykol entfernt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform erfolgt in Stufe (b) die Inaktivierung von infektiösen Agenzien in Gegenwart des Polyethers durch eine physikalische, physikalisch-chemische oder chemische Behandlung mit der Maßgabe, daß eine Detergens-Behandlung ausgenommen ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb eine pharmazeutische Präparation gemäß Anspruch 1. Bevorzugte Ausführungen davon sind Gegenstand der Ansprüche 2 bis 10, 28 bis 33 und 49.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren gemäß Anspruch 11 oder 34 zur Herstellung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Präparationen.

Bevorzugte Ausgestaltungen dieser Verfahren sind Gegenstand der Ansprüche 12 bis 27, 35 bis 48 und 50.

Es wurde überraschenderweise gefunden, daß der Zusatz eines Polyethers, wie z.B. Polyethylenglykol, in einer Konzentration von 5 bis 30 Gew.-%, einen unerwartet positiven Effekt auf eine Inaktivierungsbehandlung zur Beseitigung von

Infektiosität ausübt. Dadurch können die Bedingungen der Inaktivierungsbehandlung so gewählt werden, daß die biologische Aktivität der Plasmaproteine weitgehend erhalten bleibt.

Die Konzentration des Polyethers wird so gewählt, daß keine Fällungsreaktionen verursacht werden. Es soll bereits an dieser Stelle erwähnt werden, daß auch bei Zusatz von chaotropen Salzen die Behandlung vorzugsweise so durchgeführt wird, daß Proteine nicht gefällt werden. Die Präzipitation von Proteinen birgt nämlich die Gefahr in sich, daß infektiöse Partikel im Präzipitat eingeschlossen sind. Dadurch werden die infektiösen Partikel einer Inaktivierungsbehandlung schlecht zugänglich. In Abwesenheit eines Präzipitats ist daher keine verzögerte Inaktivierung von infektiösen Agenzien zu beobachten. Ebenso ist es möglich, die Temperatur einer Wärmebehandlung bei gleichbleibender Effektivität herabzusetzen.

Die verbesserte Inaktivierungsbehandlung in Gegenwart eines Polyethers konnte nicht erwartet werden. Es wurde nämlich erstmals gefunden, daß in Gegenwart eines Polyethers alleine, beispielsweise Polyethylenglykol, vorhandene Viren inaktiviert werden.

Die Behandlung zur Inaktivierung von infektiösen Agenzien umfaßt vorzugsweise eine Wärmebehandlung, insbesondere bei einer Temperatur von 20 bis 60°C, vorzugsweise im Bereich von 25 bis 45°C.

Als geeigneter Polyether wird vorzugsweise Polyethylenglykol, und besonders bevorzugt ein niedermolekulares Polyethylenglykol verwendet. Als besonders geeignete Polyethylenglykole sind hier solche zu nennen, die aus der Gruppe PEG 200, PEG 300, PEG 400, PEG 600, PEG 900 und

PEG 1000 ausgewählt werden. Zur Entfernung des Polyethers eignen sich eine Reihe von bekannten Maßnahmen. Das Plasmaprotein wird aus der behandelten Lösung vorteilhafterweise durch Präzipitation oder Adsorption, vorzugsweise durch Chromatographie, entfernt. Der Polyether verbleibt hingegen in Lösung und wird so vom Plasmaprotein abgetrennt. Die Entfernung des Polyethers erfolgt vollständig bzw. bis zu einem physiologisch akzeptablen Gehalt im verabreichungsfertigen Präparat.

Gemäß der Erfindung kann vorgesehen sein, daß nach Zugabe eines Polyethers zu einer das Plasmaprotein enthaltenden Lösung dieselbe lyophilisiert wird, so daß die anschließende Behandlung des Plasmaproteins zur Inaktivierung von infektiösen Agenzien in Gegenwart des Polyethers im festen Zustand als Lyophilisat erfolgt. Diese Behandlung stellt eine physikalisch-chemische oder eine chemische Behandlung dar. Dazu zählt z.B. auch eine Behandlung in Gegenwart von viruziden Substanzen, gegebenenfalls kombiniert mit einer Strahlenbehandlung oder Hitzebehandlung.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Inaktivierung von infektiösen Agenzien durch Behandlung einer Lösung oder eines Lyophilisats der Präparation in Gegenwart von zusätzlich einem chaotropen Agens. Es hat sich herausgestellt, daß durch die Kombination eines chaotrop wirksamen Salzes, wie z.B. Thiocyanat, mit einem Polyether, wie z.B. Polyethylenglykol, ein synergistischer Effekt auf die Inaktivierung von Viren beobachtet wird, wobei die biologische Aktivität der Präparation im wesentlichen erhalten bleibt. So werden auch resistente Viren, wie Vaccinia-Virus oder Parvovirus, im Vergleich zu einer Behandlung mit Thiocyanat alleine, wesentlich rascher und bei geringeren Konzentrationen an Thiocyanat inaktiviert. Die Reduktion der Thiocyanat-Konzentration und der

Behandlungsdauer wirkt sich wiederum vorteilhaft auf die biologische Aktivität des Präparates aus.

Als chaotropes Agens wird beispielsweise ein Thiocyanat, Harnstoff oder ein Guanidiniumsalz verwendet. Unter den letzteren sind insbesondere Natrium-, Ammonium- oder Kaliumthiocyanat zu nennen. Als Guanidiniumsalz ist insbesondere Guanidiniumhydrochlorid bevorzugt.

Die chaotropen Agenzien werden in Konzentrationen von ca. 0,1 bis 2 M verwendet. Auch hier wird, wie bei der bereits vorstehend beschriebenen Verfahrensvariante, die Behandlung in Gegenwart von zusätzlich chaotropen Salzen unter Bedingungen durchgeführt, bei denen Proteine nicht gefällt werden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es erstmals möglich, labile Plasmaproteine, d.h. leicht denaturierbare Proteine, in Gegenwart von chaotropen Salzen in Lösung zu behandeln und die biologische Aktivität der Plasmaproteine im wesentlichen zu erhalten.

Der Zusatz eines Polyethers während der Virusinaktivierung ermöglicht also die Herstellung einer pharmazeutischen Präparation, die Plasmaproteine enthält, welche weitgehend frei von Denaturierungsprodukten sind.

Die Entfernung des chaotropen Agens erfolgt ebenso auf an sich bekannte Weise bis zu einem Gehalt, der die physiologische Verträglichkeit des Präparates nicht beeinträchtigt. Vorzugsweise soll dieser Gehalt unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Zur Entfernung von chaotrop wirksamen Salzen kann die plasmaproteinhaltige Lösung dialysiert bzw. ultrafiltriert werden. Gleichzeitig mit dieser physikalischen Behandlung werden potentiell vorhandene infektiöse Partikel

abgetrennt. Andererseits kann das Plasmaprotein durch Präzipitation und/oder Adsorption, vorzugsweise durch Chromatographie, vom chaotropen Agens abgetrennt werden.

In einer der vorstehend genannten zweckmäßigen erfindungsgemäßen Ausführungsformen wird in Stufe (b) eine Detergensbehandlung ausgenommen; unter einer solchen Detergensbehandlung ist eine Behandlung mit für eine Virusinaktivierung gemäß dem Stand der Technik üblicherweise verwendeten Detergentien im engeren Sinne zu verstehen, d.h. also mit z.B. Tensiden, wie die für derartige Zwecke eingesetzten oberflächenaktiven Mittel, z.B. insbesondere Polyoxyethylenderivate der Sorbitanester (Polysorbat), die unter dem Warenzeichen "Tween" erhältlich sind. Solche Detergentien werden im Zusammenhang mit einer Virusinaktivierung, zumindest in Kombination mit anderen Maßnahmen, z.B. beschrieben in EP-A-479597 (wo insbesondere Tween 80 verwendet wird), US-A-4764369 (nach der die Virusinaktivierung mit Di- oder Trialkylphosphat in Kombination mit Detergentien durchgeführt wird), und EP-B-0050061 (worin die Virusinaktivierung und Verringerung oder Beseitigung von Substanzen, die unerwünschte Wirkungen, z.B. Pyrogenizität besitzen, durch Zugabe eines amphiphilen Mittels erfolgt, das z.B. ein Gallensäuresalz, ausgewählt aus Natriumcholat und Natriumdeoxycholat, oder ein nicht-ionisches Tensid ausgewählt aus den polyoxyethylierten Derivaten der partiellen Ester von C₁₂-C₂₂-Fettsäuren und Anhydriden ist).

Unter den erfindungsgemäß ausgenommenen Detergentien sind insbesondere zu verstehen:

- Nicht-ionische Detergentien, Polyoxyethylenderivate von Fettsäuren, partielle Ester von Sorbit(ol)anhydriden, wie z.B. "Tween 80", "Tween 20" und "Polysorbat 80", und nicht-

ionische öllösliche Detergentien, wie sie unter dem Warenzeichen "Triton X-100" (oxyethyliertes Alkylphenol) vertrieben werden, sowie außerdem Natriumdeoxycholat, und sogenannte "Zwittergents", d.h. synthetische zwitterionische Detergentien, die als "Sulfobetaine" bekannt sind, wie z.B. N-Dodecyl-N,N-dimethyl-2-ammonio-1-ethansulfonat, und ähnliche Substanzen, oder nicht-ionische Detergentien, wie z.B. Octyl-beta-D-glucopyranosid.

Im allgemeinen sind nicht-ionische oberflächenaktive oxyethylierte Alkylphenole Polyoxyethylensorbitanfettsäureester, Polyoxyethylensäuren und Polyoxyethylenoxypropylenfettsäuren. Spezifische Beispiele davon sind die folgenden:

Alkylphenoxypolyethoxy (30) ethanol
Polyoxyethylen (2) sorbitanmonolaurat
Polyoxyethylen (20) sorbitanmonopalmitat
Polyoxyethylen (20) sorbitanmonostearat
Polyoxyethylen (20) sorbitantristearat
Polyoxyethylen (20) sorbitanmonooleat
Polyoxyethylen (20) sorbitantrioleat
Polyoxyethylen (20) palmitat
Polyoxyethylen (20) laurylether
Polyoxyethylen (20) cetylether
Polyoxyethylen (20) stearylether
Polyoxyethylen (20) oleylether
Polyoxyethylen (20) hydriertes Castoröl
Polyoxyethylen (20) oxypropylenmonostearat.

Amphiphile oberflächenaktive Mittel, die sowohl hydrophile wasserlösliche als auch hydrophobe wasserunlösliche Gruppen enthalten, und die häufig in anionische, kationische, ampholytische und nicht-ionische oberflächenaktive Mittel

eingeteilt werden; Beispiele für solche amphiphile, erfindungsgemäß ausgeschlossene Detergentien sind:

Anionische Mittel:

Sulfatiertes oxyethyliertes Alkylphenol (Triton W-30®);
sulfatierter Lauryletheralkohol;
Natriumdodecylbenzolsulfonat (Nacconol NR®);
Natrium 2-sulfoethyloleat (Igepon A®);
Natrium N-methyl-N-oleylethanol sulfonat (Igepon T®);
Natriumdodecylsulfat;
Natriumcholat;
Natriumdeoxycholat;
Natriumdodecylsulfonat;
Natriumdodecyl-N-sarconisat.

Kationische Mittel:

Dodecyldimethylbenzylammoniumchlorid (Triton K-60®);
oxyethylierte Amine (Ethomeen®);
Cetyltrimethylammoniumbromid;
Tetradecylammoniumbromid;
Dodecylpyrimidiniumchlorid;
Hexadecyltrimethylammoniumchlorid.

Ampholytische Mittel:

Dodecyl beta-alanin;
N-Dodecylaminoethansulfonsäure;
Palmitoyllysolecithin;
Dodecyl-N-betain.

Oxyethylierte Alkylphenole (Triton X-100®), partielle Ester von C₁₂-C₂₂-Fettsäuren (z.B. Laurin-, Palmitin-, Stearin- und Ölsäuren) und Hexitanhydride (z.B. Hexitane und Hexide) (Spans), wie sie z.B. in den US-Patenten 2232820, 2232821, 2303432 beschrieben werden; polyoxyethylierte Derivate dieser partiellen Ester, die durch Addition von Polyoxyethylenketten

an nicht-esterifizierte Hydroxylgruppen erhalten werden (Tween®, z.B. Tween 80® oder Polysorbat 80®) wie z.B. in US-Patent 2380166 beschrieben; partielle polyoxyethylierte Fettsäureester (Myrj45®); Polyoxyethylenfettsäurealkoholether (Brij®).

Unter den ausgeschlossenen oxyethylierten Alkylphenolen (Triton X), sind insbesondere zu nennen die der Formel $RC_6H_4(OC_2H_4)_nOH$, worin R Octyl oder Nonyl ist und n mindestens 3 bedeutet, wie z.B. Octylphenoxyethanol; solche oberflächenaktive Mittel werden unter dem Warenzeichen "Triton X", z.B. Triton x-100, Triton X-165, Triton X-205, Triton X-305, Triton X-405 und Triton N-100 vertrieben.

Als weitere Detergentien, die gemäß der erfindungsgemäßen zweckmäßigen Ausführungsform ausgenommen sind, sind die amphiphilen Detergentien: Gallensäuresalze, wie z.B. Natriumcholat und Natriumdeoxycholat.

Die erfindungsgemäße pharmazeutische Präparation zeichnet sich überraschenderweise vor allem durch ein sehr geringes Ausmaß an Denaturierung aus. Die biologische Aktivität des Plasmaproteins nach Inaktivierung von infektiösen Agenzien ist - im Vergleich zur Aktivität von der Inaktivierungsbehandlung - zu mindestens 50 %, vorzugsweise mindestens 80 %, am meisten bevorzugt zu mindestens 90 % erhalten.

Die biologische Aktivität der erfindungsgemäßen Präparation wird im Falle eines Faktors der Gerinnung, Fibrinolyse oder Thrombolyse, oder dessen Inhibitor gemessen durch seinen Einfluß auf die enzymatische Reaktion im Rahmen der Blutgerinnung. Die biologische Aktivität eines Immunglobulins kann nach der Auftrennung des Präparates mittels HPLC-Chromatographie beurteilt werden. Etwaige

Denaturierungsprodukte bzw. Aggregate werden so von Immunglobulin-monomeren bzw. -dimeren abgetrennt und quantitativ bestimmt.

Der positive Effekt auf die Inaktivierung von infektiösen Agenzien durch Polyether, wie z.B. Polyethylenglykol, war für den Fachmann überraschend. Es war allgemein bekannt, daß Substanzen, die Plasmaproteine stabilisieren, auch eine stabilisierende Wirkung auf Viren ausüben. In diesem Zusammenhang sei z.B. auf eine Veröffentlichung von B. Horowitz et al. in Transfusion, 25, 523-527 (1985) verwiesen. Danach war in Gegenwart eines Polyethers eine verschlechterte Inaktivierungskinetik zu erwarten.

Das erfindungsgemäße Verfahren wird so lange durchgeführt, daß potentiell vorhandene Viren aus der Gruppe der großen membranumhüllten RNA-Viren, kleinen membranumhüllten RNA-Viren und der membranumhüllten DNA-Viren vollständig inaktiviert werden. Dies kann durch Versuche mit Modellviren bestätigt werden. Die Bedingungen des erfindungsgemäßen Verfahrens werden so gewählt, daß ein dem biologischen Präparat zugesetztes Virus aus jeder Gruppe durch das erfindungsgemäße Verfahren inaktiviert wird, so daß der Virustiter unter der Nachweisgrenze liegt. Als Modellvirus eignen sich vor allem HIV, FSME-Virus und Pseudorabies-Virus (PSR).

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere zur Inaktivierung von Hepatitis-Viren, vor allem von Hepatitis B, Hepatitis C und non-A-non-B-Hepatitisviren sowie von Retroviren, vor allem von AIDS-Viren.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele noch näher erläutert:

1. Inaktivierung von Modellviren in einer Gammaglobulin-haltigen Lösung mit Thiocyanat in Gegenwart von Polyethylenglykol

Eine 10%ige Lösung, enthaltend ein i.m.verträgliches Gammaglobulin wurde hergestellt durch eine Plasmafraktionierung nach Cohn. Die Lösung wurde mit einer Suspension, enthaltend HIV-1, FSME-Virus oder PSR-Virus versetzt. Der Lösung wurde Ammoniumthiocyanat bis zu einer Konzentration von 0,3 M und PEG 200 bis zu einem Gehalt von 10 Gew.-% zugesetzt. Anschließend wurde auf 30°C erwärmt und der jeweilige Virustiter nach 0,1, 3, 6 und 10 h bestimmt. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle angeführt. Als Kontrollwert diente der Virustiter in der verwendeten Virussuspension. Der Virustiter zur Zeit der Behandlungsdauer 0 ist jeweils in den Tabellen aufgeführt.

Mittels HPLC konnte festgestellt werden, daß es durch die Inaktivierungsbehandlung zu keiner Aggregatbildung gekommen ist.

Tabelle 1

Zeit (h)						
	Kontrolle	0	1	3	6	10
HIV-1	107,9	102,1	$\leq 100,5$	$\leq 100,5$	$\leq 100,5$	$\leq 100,5$
FSME	107,5	102,9	100,6	< 100	< 100	< 100
PSR	107,9	105,6	$\leq 100,5$	$\leq 100,5$	$\leq 100,5$	$\leq 100,5$

2. Vergleichsbeispiel mit jeweils nur Ammoniumthiocyanat bzw. Polyethylenglykol

Der Gammaglobulin-haltigen Lösung aus Beispiel 1 wurde in einem Ansatz Ammoniumthiocyanat in einer Konzentration von 0,3 M zugegeben. In einem weiteren Ansatz wurde der Gammaglobulin-haltigen Lösung aus Beispiel 1 PEG 200 bis zu einem Gehalt von 10 bzw. 30 % zugegeben. Die Lösungen wurden mit einer HIV-1-haltigen Suspension versetzt und auf einer Temperatur von 30°C gehalten. Der Virustiter wurde 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 6 und 10 h bestimmt. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle angeführt.

Tabelle 2

Virustiter Behandlungsdauer (h)									
	Kontrolle	0	1	1.5	2	3	6	10	
PEG 10 %	10 ^{7,4}	10 ^{6,1}	10 ^{6,5}	n.b.	n.b.	10 ^{6,2}	10 ^{5,9}	10 ^{5,7}	
PEG 30 %	10 ^{7,4}	10 ^{5,9}	10 ^{4,5}	n.b.	n.b.	10 ^{2,9}	≤10 ^{1,5}	≤10 ^{1,5}	
NH ₄ SCN 0,3 M	10 ^{7,4}	10 ^{5,5}	10 ^{3,0}	10 ^{2,6}	≤10 ^{0,5}	≤10 ^{0,5}	n.b.	n.b.	

n.b. = nicht bestimmt

Aus Tabelle 2 ist deutlich erkennbar, daß beide Agenzien allein im Vergleich zur Kombination einen deutlich geringeren virusinaktivierenden Effekt auf HIV-1 ausüben. Dagegen ist aus Tabelle 1 ersichtlich, daß der Effekt der Kombination ein synergistischer ist, zumal die Inaktivierungskinetik der Kombination aus Polyether und chaotropem Agens wesentlich rascher verläuft als die Addition der Kinetik, die durch die einzelnen Agenzien erreicht wird.

P A T E N T A N S P R Ü C H E

1. Pharmazeutische Präparation, enthaltend ein Plasmaprotein, welche Präparation frei von infektiösen Agenzien sowie weitgehend frei von Denaturierungsprodukten ist und erhältlich ist durch ein Verfahren, das die folgenden Schritte umfaßt:

- a) Zugabe eines Polyethers zu einer das Plasmaprotein enthaltenden Lösung, gegebenenfalls Lyophilisierung der Lösung,
- b) Inaktivierung von infektiösen Agenzien in Gegenwart des Polyethers durch eine physikalisch-chemische oder chemische Behandlung, und
- c) Entfernung des Polyethers.

2. Pharmazeutische Präparation nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man in Stufe (b) die Inaktivierung von infektiösen Agenzien in Gegenwart des Polyethers und eines chaotropen Agens durchführt und in Stufe (c) den Polyether und das chaotrope Agens entfernt.

3. Pharmazeutische Präparation nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Polyether einen Polyhydroxyether darstellt.

4. Pharmazeutische Präparation nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Polyhydroxyether ein Polyalkylenglykol, wie z.B. ein Polyethylenglykol oder Polypropylenglykol darstellt.

5. Pharmazeutische Präparation nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Polyether ein niedermolekulares Polyethylenglykol ist.

6. Pharmazeutische Präparation nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das niedermolekulare

Polyethylenglykol aus der Gruppe PEG 200, PEG 300, PEG 400, PEG 600, PEG 900 und PEG 1000 ausgewählt wird.

7. Pharmazeutische Präparation nach einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Inaktivierung von infektiösen Agenzien bei einer Konzentration des Polyethers von 5 bis 30 Gew.-% erfolgt, wobei Proteine nicht präzipitiert werden.

8. Pharmazeutische Präparation nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß ein Immunglobulin enthalten ist.

9. Pharmazeutische Präparation nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß ein Faktor der Gerinnung, Fibrinolyse oder Thrombolyse oder eine Inhibitorsubstanz derselben enthalten ist.

10. Pharmazeutische Präparation nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die biologische Aktivität des Plasmaproteins nach Inaktivierung von infektiösen Agenzien zu mindestens 50 %, vorzugsweise mindestens 80 %, am meisten bevorzugt mindestens 90 % erhalten ist.

11. Verfahren zur Herstellung eines biologischen Präparates unter Inaktivierung von Viren der Gruppe der großen, membranumhüllten RNA-Viren, kleinen, membranumhüllten RNA-Viren, und membranumhüllten DNA-Viren, wobei die biologische Aktivität des Präparates im wesentlichen beibehalten wird, gekennzeichnet durch eine Behandlung des Präparates zur Inaktivierung von infektiösen Agenzien in Gegenwart eines Polyethers und gegebenenfalls eines chaotropen Agens.

12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß eine Lösung des Präparates behandelt wird.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß eine physikalisch-chemische oder eine

chemische Behandlung zur Inaktivierung von infektiösen Agenzien vorgenommen wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß als Polyether ein Polyhydroxyether verwendet wird.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß als Polyhydroxyether Polyethylenglykol oder Polypropylenglykol verwendet wird.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Inaktivierung von infektiösen Agenzien in Anwesenheit eines niedermolekularen Polyethylenglykols, ausgewählt aus der Gruppe PEG 200, PEG 300, PEG 400, PEG 600, PEG 900 und PEG 1000, erfolgt.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Inaktivierung von infektiösen Agenzien in Gegenwart eines Polyethers in einer Konzentration von 5 bis 30 Gew.-% erfolgt, wobei Proteine nicht präzipitiert werden.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß das chaotrope Agens ausgewählt ist aus der Gruppe Thiocyanate, Harnstoff und Guanidiniumsalze.

19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß als Thiocyanat Ammonium-, Natrium- oder Kaliumthiocyanat verwendet wird.

20. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß als Guanidiniumsalz Guanidiniumhydrochlorid verwendet wird.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß das chaotrope Agens in einer Konzentration von 0,1 bis 2 M eingesetzt wird.

22. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß als chaotropes Agens ein Thiocyanat in einer Konzentration von 0,1 bis 2 M eingesetzt wird.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Behandlung bei einer Temperatur im Bereich von 20 bis 60 °C durchgeführt wird.

24. Verfahren nach den Ansprüchen 11 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Behandlung während einer Dauer von 1 bis 10 h durchgeführt wird.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß das Plasmaprotein ein Immunglobulin umfaßt.

26. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß als Plasmaprotein ein Faktor der Gerinnung, Fibrinolyse oder Thrombolyse oder eine Inhibitorsubstanz derselben vorliegt.

27. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Behandlung unter Bedingungen durchgeführt wird, unter denen die biologische Aktivität des Präparates zu mindestens 50 %, vorzugsweise mindestens 80 %, am meisten bevorzugt mindestens 90 % erhalten wird.

28. Pharmazeutische Präparation nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man in Stufe (a) als Polyether ein niedermolekulares Polyethylenglykol ausgewählt aus der Gruppe PEG 200, PEG 300, PEG 400, PEG 600, PEG 900 und PEG 1000 zugibt,

(b) die Inaktivierung von infektiösen Agenzien in Gegenwart des Polyethylenglykols durchführt, und

(c) das Polyethylenglykol entfernt.

29. Pharmazeutische Präparation nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß zur Inaktivierung von infektiösen Agenzien zusätzlich ein chaotropes Agens zugegeben wird.

30. Pharmazeutische Präparation nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Inaktivierung von infektiösen Agenzien bei einer Konzentration des Polyethylenglykols von 5 bis 30 Gew.-% erfolgt, wobei Proteine nicht präzipitiert werden.

31. Pharmazeutische Präparation nach einem der Ansprüche 28 bis 30, dadurch gekennzeichnet, daß ein Immunglobulin enthalten ist.

32. Pharmazeutische Präparation nach einem der Ansprüche 28 bis 31, dadurch gekennzeichnet, daß ein Faktor der Gerinnung, Fibrinolyse oder Thrombolyse oder eine Inhibitorsubstanz derselben enthalten ist.

33. Pharmazeutische Präparation nach einem der Ansprüche 28 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß die biologische Aktivität des Plasmaproteins nach Inaktivierung von infektiösen Agenzien zu mindestens 50 %, vorzugsweise mindestens 80 %, am meisten bevorzugt mindestens 90 % erhalten ist.

34. Verfahren zur Herstellung eines biologischen Präparates unter Inaktivierung von Viren der Gruppe der großen, membranumhüllten RNA-Viren, kleinen, membranumhüllten RNA-Viren, und membranumhüllten DNA-Viren, wobei die biologische Aktivität des Präparates im wesentlichen beibehalten wird, gekennzeichnet durch eine Behandlung des Präparates zur Inaktivierung von infektiösen Agenzien in Gegenwart eines Polyethers, der vorzugsweise ein niedermolekulares Polyethylenglykol ist, ausgewählt aus der Gruppe PEG 200, PEG 300, PEG 400, PEG 600, PEG 900 und PEG 1000.

35. Verfahren nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß eine Lösung des Präparates behandelt wird.

36. Verfahren nach Anspruch 34 oder 35, dadurch gekennzeichnet, daß eine physikalisch-chemische oder eine chemische Behandlung zur Inaktivierung von infektiösen Agenzien vorgenommen wird.

37. Verfahren nach einem der Ansprüche 34 bis 36, dadurch gekennzeichnet, daß die Inaktivierung von infektiösen Agenzien in Gegenwart des Polyethylenglykols in einer

Konzentration von 5 bis 30 Gew.-% erfolgt, wobei Proteine nicht präzipitiert werden.

38. Verfahren nach einem der Ansprüche 34 bis 37, dadurch gekennzeichnet, daß zur Inaktivierung von infektiösen Agenzien neben dem Polyethylenglykol ein chaotropes Agens eingesetzt wird.

39. Verfahren nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß das chaotrope Agens ausgewählt ist aus der Gruppe Thiocyanate, Harnstoff und Guanidiniumsalze.

40. Verfahren nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß als Thiocyanat Ammonium-, Natrium- oder Kaliumthiocyanat verwendet wird.

41. Verfahren nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß als Guanidiniumsalz Guanidiniumhydrochlorid verwendet wird.

42. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 bis 41, dadurch gekennzeichnet, daß das chaotrope Agens in einer Konzentration von 0,1 bis 2 M eingesetzt wird.

43. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 bis 40, dadurch gekennzeichnet, daß als chaotropes Agens ein Thiocyanat in einer Konzentration von 0,1 bis 2 M eingesetzt wird.

44. Verfahren nach einem der Ansprüche 34 bis 43, dadurch gekennzeichnet, daß die Behandlung bei einer Temperatur im Bereich von 20 bis 60 °C durchgeführt wird.

45. Verfahren nach einem der Ansprüche 34 bis 44, dadurch gekennzeichnet, daß die Behandlung während einer Dauer von 1 bis 10 h durchgeführt wird.

46. Verfahren nach einem der Ansprüche 34 bis 45, dadurch gekennzeichnet, daß das Plasmaprotein ein Immunglobulin umfaßt.

47. Verfahren nach einem der Ansprüche 34 bis 46 dadurch gekennzeichnet, daß als Plasmaprotein ein Faktor der Gerinnung, Fibrinolyse oder Thrombolyse oder eine Inhibitorsubstanz derselben vorliegt.

48. Verfahren nach einem der Ansprüche 34 bis 47, dadurch gekennzeichnet, daß die Behandlung unter Bedingungen durchgeführt wird, unter denen die biologische Aktivität des Präparates zu mindestens 50 %, vorzugsweise mindestens 80 %, am meisten bevorzugt mindestens 90 % erhalten wird.

49. Pharmazeutische Präparation nach einem der Ansprüche 1 bis 10 und 28 bis 33, dadurch gekennzeichnet, daß in Stufe (b) die Inaktivierung von infektiösen Agenzien in Gegenwart des Polyethers durch eine physikalische, physikalisch-chemische oder chemische Behandlung mit der Ausnahme einer Detergensbehandlung erfolgt.

50. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 27 und 34 bis 48, dadurch gekennzeichnet, daß die Inaktivierung in Gegenwart des Polyethers und gegebenenfalls eines chaotropen Agens durch eine physikalische, physikalisch-chemische oder chemische Behandlung mit der Ausnahme einer Detergensbehandlung erfolgt.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 94/03298

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 A61L2/18 A61K35/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A61L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 099 445 (NEW YORK BLOOD CENTER) 1 February 1984	1,9-12, 14,17, 23,24, 26,27, 34,35, 44,45, 47,48 8,46
Y	see page 11, line 11; claims 12,18 ---	
Y	EP,A,0 083 999 (SHANBROM E.) 20 July 1983 see page 8, line 25; claims 1,3 ---	8,46
A	FR,A,2 339 621 (RECHERCHES HEMATOLOGIQUES) 26 August 1977 see page 7, line 33 - line 34; claim 6 --- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

G document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 February 1995

Date of mailing of the international search report

08.02.95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Peltre, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No

PCT/EP 94/03298

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US,A,4 315 919 (SHANBROM E.) 16 February 1982 see column 2, line 18 ----	
A	EP,A,0 530 173 (HÄMOSAN) 3 March 1993 see claims 1-5 ----	2,18,19
A	EP,A,0 177 836 (GREEN CROSS) 16 April 1986 see claims 1,2; example 3; tables 1,2 -----	4,8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 94/03298

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
EP-A-0099445	01-02-84	US-A-	4481189	06-11-84
		AU-B-	561900	21-05-87
		AU-A-	1346283	20-10-83
		CA-A-	1207229	08-07-86
		JP-B-	6060105	10-08-94
		JP-A-	58222023	23-12-83
		US-A-	4591505	27-05-86

EP-A-0083999	20-07-83	US-A-	4412985	01-11-83
		CA-A-	1195924	29-10-85
		JP-A-	58118518	14-07-83

FR-A-2339621	26-08-77	AT-B-	354632	25-01-79
		BE-A-	850852	28-07-77
		CA-A-	1101332	19-05-81
		DE-A, C	2703620	04-08-77
		GB-A-	1557609	12-12-79
		JP-C-	1439780	19-05-88
		JP-A-	52102410	27-08-77
		JP-B-	62042887	10-09-87
		LU-A-	76652	13-09-78
		NL-A-	7700927	02-08-77
		SE-B-	442953	10-02-86
		SE-A-	7700864	31-07-77

US-A-4315919	16-02-82	EP-A, B	0050061	21-04-82
		US-A-	4412985	01-11-83

EP-A-0530173	03-03-93	NONE		

EP-A-0177836	16-04-86	JP-B-	6069961	07-09-94
		JP-A-	61078730	22-04-86
		CA-A-	1268707	08-05-90
		US-A-	4721777	26-01-88

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61L2/18 A61K35/16

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 A61L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP,A,0 099 445 (NEW YORK BLOOD CENTER) 1. Februar 1984	1,9-12, 14,17, 23,24, 26,27, 34,35, 44,45, 47,48 8,46
Y	siehe Seite 11, Zeile 11; Ansprüche 12,18 ---	
Y	EP,A,0 083 999 (SHANBROM E.) 20. Juli 1983 siehe Seite 8, Zeile 25; Ansprüche 1,3 ---	8,46
A	FR,A,2 339 621 (RECHERCHES HEMATOLOGIQUES) 26. August 1977 siehe Seite 7, Zeile 33 - Zeile 34; Anspruch 6 --- -/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. Februar 1995

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

08.02.95

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Peltre, C

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US,A,4 315 919 (SHANBROM E.) 16. Februar 1982 siehe Spalte 2, Zeile 18 ---	
A	EP,A,0 530 173 (HÄMOSAN) 3. März 1993 siehe Ansprüche 1-5 ---	2,18,19
A	EP,A,0 177 836 (GREEN CROSS) 16. April 1986 siehe Ansprüche 1,2; Beispiel 3; Tabellen 1,2 -----	4,8

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 94/03298

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A-0099445	01-02-84	US-A- 4481189	06-11-84
		AU-B- 561900	21-05-87
		AU-A- 1346283	20-10-83
		CA-A- 1207229	08-07-86
		JP-B- 6060105	10-08-94
		JP-A- 58222023	23-12-83
		US-A- 4591505	27-05-86

EP-A-0083999	20-07-83	US-A- 4412985	01-11-83
		CA-A- 1195924	29-10-85
		JP-A- 58118518	14-07-83

FR-A-2339621	26-08-77	AT-B- 354632	25-01-79
		BE-A- 850852	28-07-77
		CA-A- 1101332	19-05-81
		DE-A, C 2703620	04-08-77
		GB-A- 1557609	12-12-79
		JP-C- 1439780	19-05-88
		JP-A- 52102410	27-08-77
		JP-B- 62042887	10-09-87
		LU-A- 76652	13-09-78
		NL-A- 7700927	02-08-77
		SE-B- 442953	10-02-86
		SE-A- 7700864	31-07-77

US-A-4315919	16-02-82	EP-A, B 0050061	21-04-82
		US-A- 4412985	01-11-83

EP-A-0530173	03-03-93	KEINE	

EP-A-0177836	16-04-86	JP-B- 6069961	07-09-94
		JP-A- 61078730	22-04-86
		CA-A- 1268707	08-05-90
		US-A- 4721777	26-01-88
